

子宮頸部異形成ならびに頸癌における ras 癌遺伝子産物 p21 の発現に関する研究

久田 孝司 寒河江 悟 工藤 隆一

札幌医科大学産婦人科学講座 (主任 橋本正淑 教授)

The Expression of ras Oncogene Product p21 in Dysplasia and Cancer of the Uterine Cervix

Takashi HISADA, Satoru SAGAE and Ryuichi KUDO

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. Hashimoto)

ABSTRACT Expression of ras p21 in human uterine cervical cancer, benign and precancerous lesions (dysplasia) and normal squamous epithelium was immunohistochemically evaluated by the avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase method with anti-ras p21 mouse monoclonal antibody rp-35.

The positive p21 rate was 0% in normal squamous epithelium, 10.0% in squamous metaplasia, 17.9% in mild dysplasia, 28.9% in moderate dysplasia, 47.8% in severe dysplasia, 56.6% in carcinoma in situ, and 50.0% in microinvasive carcinoma.

In the follow-up studies of patients with mild or moderate dysplasia, ten regressive cases showed 20.0% ras p21 positivity, but 14 progressive cases which developed into more malignant lesions showed 50.0% ras p21 positivity.

Furthermore, we studied the reactivity of 170 squamous cell carcinomas of the uterine cervix of various histological types and 11 regional metastatic lymphnodes. The expression of p21 was noted in 57.1% of keratinizing type, 54.2% of large cell non-keratinizing type, 38.7% of small cell non-keratinizing type, and 54.5% of regional metastatic lymphnode.

There was no significant difference between the p21 positivity and clinical stage or lymphnode metastasis.

It was suggested that the intervention of ras oncogene in human uterine cervical cancer occurred in early carcinogenesis more profoundly than in progression of cancer and in metastasis of regional lymphnode.

(Received February 28, 1989 and accepted March 28, 1989)

Key words: ras oncogene product p21, Immunohistochemistry, Dysplasia, Squamous cell carcinoma, Uterine cervix.

1 緒 言

種々の癌において、癌遺伝子が、その癌化あるいは癌の進展に関与していると考えられている^{1,2)}。現在 40 種類以上の癌遺伝子の存在が確認されているが、その中でも ras 癌遺伝子は、ヒト腫瘍に関係すると考えられ、注目されているものの一つである³⁾。しかし、子宮頸癌

については、これまで ras 癌遺伝子の関与についてあまり検討されていなかった。

そこで我々は、子宮頸部扁平上皮癌の癌化、進展および転移における ras 癌遺伝子の関与を検討する目的で、正常子宮頸部扁平上皮、異形成上皮、上皮内癌、微小浸潤癌、浸潤癌、転移リンパ節における ras 癌遺伝子産物 p21 (以下 p21) の発現を免疫組織化学的に検

討した。

また、免疫組織化学的検討と対比させるために癌組織中の p21 を、一部浸潤癌症例について、Western blotting 法を用いて検討した。

2 対象および実験方法

2.1 対 象

札幌医科大学産婦人科にて診断および治療した異形成上皮 89 例（軽度異形成 28 例，中等度異形成 38 例，高度異形成 23 例），上皮内癌 53 例，微小浸潤癌（子宮頸癌 I a 期）12 例ならびに I b 期以上の浸潤癌 170 例を対象とした。I b 期以上の症例は、I b 期 48 例，II 期 77 例，III および IV 期 45 例であり，組織型別の内訳は，角化型（以下 K 型）21 例，大細胞非角化型（以下 LNK 型）118 例，小細胞非角化型（以下 S 型）31 例であった。原発巣と転移リンパ節について比較検討した症例は，11 例であった。また，良性疾患で手術を施行した症例より得られた，子宮頸部正常扁平上皮 10 例と扁平上皮化生 10 例を対照として用いた。

免疫組織化学的染色の試料は，コルボスコピー下での狙い生検，円錐切除術，子宮全摘出術，準広汎性あるいは広汎性子宮全摘出術によって得られた組織標本を，免疫組織化学的染色の試料として用いた。

また，前述した異形成上皮 89 例の中で，初回細胞診で異形成細胞が認められ，組織診で軽度または中等度異形成と診断され，以後細胞診で経過観察を行い，最短 6 カ月，最長 1 年 3 カ月（平均 10 カ月）の経過観察期間に病巣が消失した症例（以下 regress 症例）10 例，また，同様の診断をうけ，最短 1 年 5 カ月，最長 4 年 5 カ月（平均 2 年 5 カ月）の経過観察期間に病変が進行し，高度異形成，上皮内癌，微小浸潤癌になった症例（以下 progress 症例）14 例について，p21 の発現を検討した。

2.2 免疫組織化学的染色

10%中性緩衝ホルマリン固定，パラフィン包埋された被験材料を 5 μ m に薄切し，キシロール系で脱パラフィンし，アルコール系列で脱水した後，Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法⁴⁾を，一部改変して免疫組織化学的染色を行った。

即ち，内因性ペルオキシダーゼをブロックするために 0.3%過酸化水素水 (H_2O_2) 加メタノールにて 15 分処理した後，非特異的免疫反応を減少させるために 0.5%牛血清アルブミンを 20 分反応させた。次いで一次抗体として，Kuzumaki *et al*⁵⁾ が作製した 4 種類のマウスモノクローナル抗体（以下 MoAb）rp-12, 28,

35, 38 のうち，c-H-ras, c-K-ras, c-N-ras のいずれとも反応する rp-35 を 1:1,000 に希釈し，室温で 60 分反応させた。その後，ビオチン化二次抗体を反応させ，3, 3'-diaminobenzidine（以下 DAB）にて発色させた後，メチルグリーンで核染色し，ビオライト封入し検鏡した。

p21 発現の有無の免疫組織化学的判定は，染色強度については全く染色が認められない（-），ごく弱い染色しか認められない（±），明らかな染色が認められる（+），強い染色が認められる（++）の 4 段階に分け，Thor *et al*⁶⁾ の方法に準じ，腫瘍組織中の % 陽性細胞数も合わせて考慮し，染色強度が（+）以上で，なおかつ % 陽性細胞数が 20% 以上の症例を，p21 陽性と判定した。

陰性対照として，rp-35 のかわりに Rous sarcoma virus により誘発されたマウス腫瘍の細胞表面抗原に反応するマウス MoAb 3. 4B2⁷⁾ を一次抗体として用いた免疫組織化学的染色を行った。被験材料は，rp-35 を一次抗体として用いた免疫組織化学的染色で，p21 陽性を示した症例を含め，すべて陰性であった。また，陽性対象として，免疫組織化学的染色の一回毎に，EJ c-H-ras を組込んだ NIH/3T3 細胞をヌードマウスに皮下移植して誘発した，マウス腫瘍組織を免疫組織化学的染色し，常に p21 陽性を示すことを確認した。

2.3 Western blotting 法

免疫組織化学的検討を行った症例のうち浸潤癌 10 症例の組織材料を用い，Western blotting 法にて p21 の発現を検討した。

凍結保存した子宮頸癌組織材料を，実験に先立ち 10%蔗糖加 PBS で数回洗浄し，Tanaka *et al*⁸⁾ の方法に準じ，1 cm³ の大きさの被験材料を抽出用緩衝液中で細切し，ホモジナイズした後，4°C，12,000 g，30 分冷却遠心し，その上清を 7.5%SDS を含む緩衝液と等量混ぜ，4 分間煮沸した。この試料をスラブゲルの各溝に分配し，電気泳動 (SDS-PAGE) した。その後ポアサイズ 0.45 μ m のニトロセルロース膜に，38.5 V の定電圧で 5 時間 blotting した。blotting されたニトロセルロース膜を，電気泳動したゲルの溝に合わせて縦切りし，まず 0.5%Tween20-PBS, pH 7.2 で数回洗浄し，その後非特異的反応をブロックするために，3%牛血清アルブミン加 NTE-NP40⁹⁾ でニトロセルロース膜を 4°C，12 時間処理し，洗浄後一次抗体として 500 倍に希釈した MoAb rp-35 を室温で 60 分反応させた。以後の操作は組織標本材料と同様に免疫化学的染色を行い，発色には DAB を用いた。

3 結 果

3.1 各子宮頸部組織における p21 の免疫組織化学的検討

3.1.1 正常扁平上皮, 扁平上皮化生, 異形成上皮, 上皮内癌, 微小浸潤癌

個々の細胞は, 若干細胞膜の細胞質側に強く染色された症例もあったが, おおむね細胞質全体がびまん性, 細顆粒状に染色された。正常扁平上皮では, 上皮全層に全く染色は認められなかった (Fig. 1) が, 扁平上皮化生では, 1 例に化生細胞が染色された。異形成上皮では, 軽度異形成は異形成細胞に強く染色され, 中層および表層には, 概して染色がみとめられなかった (Fig. 2)。中等度異形成 (Fig. 3) および高度異形成 (Fig. 4) では, 異形成細胞を含め, ほぼ上皮全層にわたって染色される傾向を認めた。

上皮内癌では, 病巣全体がほぼ均一に染色された (Fig. 5)。微小浸潤癌でも病巣全体が染色されたが, 間質浸潤を示す部分が他の癌病巣の部分よりもやや強く染色された (Fig. 6)。

p21 陽性例は, 正常扁平上皮では認められなかったが, 扁平上皮化生では, 10 例中 1 例に認められた。異形成上皮では, 軽度, 中等度, 高度異形成の順に 28 例中 5 例 (17.9%), 38 例中 11 例 (28.9%), 23 例中 11 例 (47.8%) と, 異形成の程度が高度化するにつれて上昇した。上皮内癌では, p21 陽性例は, 53 例中 30 例 (56.6%) であり, 微小浸潤癌では, 12 例中 6 例 (50.0%) であった (Table 1)。

3.1.2 浸 潤 癌

進行期 Ib 期以上の子宮頸部扁平上皮癌では, 組織型別に K 型では 21 例中 12 例 (57.1%) が陽性であった。個々の細胞は, 細胞質全体にびまん性に染色され, 細胞膜の細胞質側に特に強く染色される症例はなかつ

た (Fig. 7)。K 型の特徴とされる癌真珠の部分では, 他の部位の癌細胞の細胞質と同様の強度で染色された。また, 粗顆粒状に強く染色された染色強度 (++) 以上の症例は, K 型では 4 例 (33.3%) であった。臨床進行期別に p21 陽性率の推移をみると, Ib 期 40.0%, II 期 60.0%, III・IV 期 66.7% と, 進行期が進むにつれて p21 陽性率も上昇した。

LNK 型では, 118 例中 64 例 (54.2%) が陽性であった。個々の細胞は, K 型と同様, 細胞質が均一に染まり, 微細顆粒状の染色性を呈するものが多く, %陽性細胞数もほぼ 100% であり, 細胞膜の細胞質側に特に強く染色されるということとはなかった (Fig. 8)。K 型と同様に, 細胞質全体が粗顆粒状に強く染色された強陽性症例は 6 例 (9.4%) であった。微細な浸潤が認められる部位でも, 他の部位と染色性に差異は認められなかった。臨床進行期別では, Ib 期 46.9%, II 期 58.5%, III・IV 期 54.5% で, K 型よりも進行期と p21 陽性率の推移に相関は認められなかった。

S 型では, 31 例中 12 例 (38.7%) が陽性であった。個々の細胞は, K, LNK 型と同様に細胞質がびまん性に染色され, %陽性細胞数もほぼ 100% で, 微細顆粒状の染色性を呈した (Fig. 9)。粗顆粒状に強く染色された強陽性症例は 1 例 (8.3%) であった。臨床進行期別では, Ib 期 45.5%, II 期 35.7%, III・IV 期 33.3% で, K, LNK 型とは逆に, 進行期が進むにつれて p21 陽性率は低下した (Table 2)。

3.1.3 転移リンパ節

転移リンパ節では, 細胞質全体がびまん性, 細顆粒状に染色された (Fig. 10)。

リンパ節転移を認めた症例の原発巣における p21 陽性例は, 11 例中 6 例 (54.5%) であった。また, 転移リンパ節における p21 陽性例は 11 例中 6 例 (54.5%) であった。原発巣と転移リンパ節の p21 発現を比較す

Table 1 ras p21 expression in normal squamous epithelium, metaplasia, dysplasia, carcinoma in situ and microinvasive carcinoma

	total cases	positive p21 cases	%
I. normal squamous epithelium	10	0	0 %
metaplasia	10	1	10.0%
II. dysplasia			
i) mild	28	5	17.9%
ii) moderate	38	11	28.9%
iii) severe	23	11	47.8%
III. carcinoma in situ	53	30	56.6%
IV. microinvasive carcinoma	12	6	50.0%

Table 2 *ras p21 expression in invasive carcinoma*

stage histological type	I b	II	III and IV	total
K type	2/5 (40.0%)	6/10 (60.0%)	4/6 (66.7%)	12/21 (57.1%)
LNK type	15/32 (46.9%)	31/53 (58.5%)	18/33 (54.5%)	64/118 (54.2%)
S type	5/11 (45.5%)	5/14 (35.7%)	2/6 (33.3%)	12/31 (38.7%)

ると、11 例中 7 例 (63.6%) において原発巣と転移リンパ節の p21 発現が一致したが、原発巣が p21 陽性だが転移リンパ節が陰性の症例が 2 例あり、その逆に、原発巣は陰性だが転移リンパ節が陽性の症例も 2 例あった (Table 3)。

3・1・4 regress 症例および progress 症例の p21 発現

regress および progress 症例の p21 免疫組織化学的染色の結果、染色分布、染色強度および % 陽性細胞数には、特に両者の差異は認められなかったが、p21 陽性率をみると、regress 症例では 20.0% (10 例中 2 例) であったのに対し、progress 症例では 50.0% (14 例中 7 例) であった。

progress 症例で 1 例が、初回診断時の中等度異形成の段階では、p21 陰性であったものが、最終診断時の微小浸潤癌の段階では、p21 陽性に転化した。その他は、初回診断時 p21 陽性であったものは、進行した病変の組織においてもすべて p21 陽性であった (Table 4)。

3・2 Western blotting 法

免疫組織化学的な判定と比較するために、浸潤癌で、免疫組織化学的に p21 陽性と判定された 6 症例と、陰性と判定された 4 症例、合計 10 症例について Western

blotting 法を行った。陽性対照として、免疫組織化学的検討と同様に、EJ c-H-ras を組み込んだ NIH/3T3 細胞を皮下移植して誘発した、マウス腫瘍の凍結組織材料を用いた。その結果、免疫組織化学的染色で陽性と判定された症例は、Western blotting 法でも陽性を示し、免疫組織化学的染色で陰性と判定された症例は、Western blotting 法でも陰性を示した (Fig. 11, Table 5)。

4 考 察

子宮頸癌における ras 癌遺伝子の関与については、免疫組織化学的な種々の臓器の癌における検討の中で、子宮頸癌においても p21 の発現が認められたという Tanaka *et al*⁸⁾ の報告があり、また子宮頸癌由来の CaSki 細胞株を用いた免疫沈降による解析で、p21 発現が認められたという Der *et al*¹⁰⁾ の報告がある。しかし、子宮頸癌と ras 癌遺伝子との関連について、詳細に検討を加えている報告は少ない。

我々は ras 癌遺伝子産物である p21 の発現の有無について免疫組織化学的に判定を行い、次いで、癌組織を用いて Western blotting 法で検討した。その結果、免疫組織化学的染色で陽性と判定された症例は Western blotting 法で、分子量 21 キロダルトンの位置にバンドが検出された。

免疫組織化学的判定については、Fromowitz *et al*¹¹⁾、Rodenburg *et al*¹²⁾ のように、免疫組織化学的染色における結果を半定量的に検討しようとする試みがあるが、基本的には Thor *et al*⁶⁾ の判定方法と同じである。

我々は、この方法に Western blotting 法を加えて、p21 の発現を検討した。

我々の免疫組織化学的検討から、子宮頸部扁平上皮の癌化過程における ras 癌遺伝子の関与は、癌化過程の比較的初期である軽度異形成の段階から認められる可能性が示唆された。

また、異形成上皮の経過観察症例における regress および progress 症例の p21 発現の検討で、regress 症例

Table 3 *ras p21 expression in primary cervical carcinoma and metastatic lymphnode*

case	primary cervical carcinoma	metastatic lymphnode
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	+
5	—	+
6	+	—
7	+	—
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+

Total p21 positive rate 6/11=54.5%

Table 4 *ras p21 expression in regressive and progressive cases*

I. Regressive cases					
Case	first histological diagnosis	p21 expression	diagnostic interval		
1	mild dys.	(-)	8M		
2	mild dys.	(-)	7M		
3	mild dys.	(-)	8M		
4	mild dys.	(-)	1Y 3M		
5	mild dys.	(-)	1Y 2M		
6	mild dys.	(-)	1Y 3M		
7	mild dys.	(-)	6M		
8	mild dys.	(+)	8M		
9	moderate dys.	(-)	8M		
10	moderate dys.	(+)	8M		
Total p21 positive rate 2/10=20.0%					
II. Progressive cases					
Case	first histological diagnosis	p21 expression	last histological diagnosis	p21 expression	diagnostic interval
1	mild dys.	(-) →	moderate dys.	(-)	1Y10M
2	mild dys.	(-) →	severe dys.	(-)	4Y 5M
3	mild dys.	(+) →	severe dys.	(+)	2Y 9M
4	mild dys.	(+) →	Carcinoma in situ	(+)	2Y 4M
5	mild dys.	(+) →	Carcinoma in situ	(+)	3Y 2M
6	mild dys.	(-) →	microinvasive Carcinoma.	(-)	1Y 5M
7	moderate dys.	(-) →	severe dys.	(-)	2Y 8M
8	moderate dys.	(+) →	severe dys.	(+)	2Y
9	moderate dys.	(-) →	severe dys.	(-)	2Y
10	moderate dys.	(+) →	Carcinoma in situ	(+)	2Y 6M
11	moderate dys.	(-) →	Carcinoma in situ	(-)	2Y
12	moderate dys.	(+) →	Carcinoma in situ	(+)	2Y 4M
13	moderate dys.	(-) →	microinvasive Carcinoma.	(+)	2Y 1M
14	moderate dys.	(+) →	microinvasive Carcinoma.	(+)	2Y 2M
Total p21 positive rate 7/14=50.0%					

に比べ progress 症例が高い p21 発現率を示したことは、子宮頸部扁平上皮癌の癌化過程において、ras 癌遺伝子が何らかの関与をしている可能性が考えられた。このことは、臨床的に、軽度あるいは中等度異形成の症例で経過観察の方針を決める時点で、子宮頸部採取組織の p21 発現をみることによって、その異形成上皮が今後進行してゆくかどうかを判断する際の補助の一つになると考えられた。

他の臓器での ras 癌遺伝子の癌化過程における関与については、Ohuchi *et al*¹³⁾ が、乳腺組織で病理組織学的悪性度に伴って p21 の発現率増大がみられ、ras 癌遺伝子の関与は、発癌過程の初期段階に認められると述べ、中島¹⁴⁾ も、良性胃病変における p21 陽性率が、胃癌に比べると低いものの正常胃組織に比べると高率であったことから、胃癌のみならず良性胃病変の発症機序においても、ras 癌遺伝子が何らかの役割を果たして

Table 5 *ras p21 expression by Western blotting and immunohistochemical staining in invasive carcinoma*

Case	p21 expression by Western blotting	p21 expression by immunohistochemical staining
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-

いる可能性があると述べている。さらに, Michelassi *et al*¹⁵⁾ は, 大腸組織において, p21 の発現増大が良性病変での悪性度を高めると述べ, p21 の発現増大が認められる危険群には, 癌になる以前から十分な経過観察あるいは治療が必要であると報告している。我々も今回の結果から, 軽度異形成および中等度異形成で p21 発現が認められた場合, 積極的に病巣の治療を行うか, 十分な経過観察が必要でないかと考えられた。また, 経過観察症例で, 初回 p21 発現が陽性であった症例は, 病変進行後の組織においても陽性で, p21 の発現は持続するものと考えられた。

p21 免疫組織化学的染色の染色性は, おおむね異形成上皮も癌も, p21 陽性例では同様であった。p21 の局在は, 電顕的には細胞膜の細胞質側といわれている¹⁶⁾ が, 我々の光顕的観察では細胞質全体にびまん性に染色され, 微細顆粒状に染色されるものが多かった。これは, p21 に対する MoAb として RAP-5⁶⁾ を用いた乳癌^{11,17)}, 胃癌^{18,19)}, 大腸癌¹⁷⁾, 卵巣癌¹²⁾, 前立腺癌²⁰⁾, 甲状腺癌²¹⁾ での報告や, RAP-5 と Y13-259²²⁾ を用いた乳癌¹³⁾ の報告, さらに rp-28⁵⁾ を用いた胃癌¹⁴⁾ の報告でも同様の染色性であると述べている。

微小浸潤癌で p21 陽性と判定された症例で, 間質浸潤部位により強く染色されたことは, 乳癌で指摘されている¹¹⁾ ように, ras 癌遺伝子と間質浸潤の間に何らかの関連があるのかもしれない。

子宮頸癌の進展に関しては, Riou *et al*²³⁾ が, myc 癌原遺伝子の検討から, c-myc 遺伝子の発現増大が認められた子宮頸癌症例は, 早期再発が 8 倍も高率となり, 生存率も低いと述べ, さらに, Ocadiz *et al*²⁴⁾ は, c-myc 癌原遺伝子の増大または再配列が, 子宮頸癌において 90% 以上に認められ, 癌の進展に関与している可能性があると述べている。今回の ras 癌遺伝子の検討では, 子宮頸癌の進展における ras 癌遺伝子の関与は, あまり認められなかった。これは, p21 陽性率が, 軽度異形成から高度異形成までは, 段階的に上昇するのに対し, 上皮内癌以降は, 癌が進展しても, p21 陽性率に明確な変化が認められなかったことから想定された。

癌の転移と ras 癌遺伝子の関係では, ある種の実験腫瘍系においては, ras 癌遺伝子は転移形成に必要な因子の発現と増強を促す可能性はあるが, 転移形成に必須な因子とはいえない²⁵⁾ と考えられており, 我々の転移リンパ節における p21 発現の検討からも, 子宮頸部扁平上皮癌のリンパ節転移に関しては, ras 癌遺伝子の関与は少ないものと考えられた。他の臓器では, 大腸癌において, リンパ節転移巣における p21 陽性細胞率が

低下, あるいは反応が消失した症例があった²⁶⁾ との報告があり, 我々の検討と同様の結果であった。

以上をまとめると, ras 癌遺伝子は子宮頸部扁平上皮癌において, 癌の進展, 転移よりも, むしろ癌化の過程により深く関与しているものと考えられた。

今後, 子宮頸癌の癌化過程における癌遺伝子の関与について検討するためには, ras 癌遺伝子以外の癌遺伝子についての検討も必要である。また, 一次抗体として用いた rp-35 は, 癌原遺伝子産物もとらえており, 点突然変異によって変異した癌遺伝子産物に特異的に反応するものではない⁵⁾ ため, 変異 p21 に特異的な MoAb による検討も必要である。さらに, 最近, ヒトパピローマウイルス 16 型と ras 癌遺伝子が, 細胞に形質転換活性を与える上で, 協調的な役割を持つという *in vitro* での報告²⁷⁾ があり, 癌遺伝子とウイルスとの関連も, 今後, 子宮頸癌の癌化過程解明のために, 重要な課題になるものと思われる。

5 結 論

子宮頸部の正常扁平上皮, 扁平上皮化生, 異形成上皮, 上皮内癌, 微小浸潤癌, 浸潤癌, 転移リンパ節における p21 発現を免疫組織化学的に検討した。さらに, 浸潤癌症例の一部について, Western blotting 法を用いて p21 の発現を調べた。

1) 正常扁平上皮では p21 発現は全くみられなかったが, 異形成上皮では, 軽度異形成 17.9%, 中等度異形成 28.9%, 高度異形成 47.8% と, 異形成の進行程度に伴って p21 陽性率は上昇した。上皮内癌では 56.6%, 微小浸潤癌では 50.0% であった。p21 の子宮頸部扁平上皮癌における関与は, 癌化の比較的初期, 即ち軽度異形成から認められるのではないかと推測された。

2) 異形成上皮の経過観察症例における regress および progress 症例の結果から, 異形成上皮の progression に, p21 が何らかの関与をしている可能性が示唆された。

3) 浸潤癌を組織型別にみると, K 型 57.1%, LNK 型 54.2%, S 型 38.7% の p21 陽性率であった。また, 臨床進行情と p21 陽性率の間には, 明らかな相関は認められなかった。

4) リンパ節転移を認めた症例の原発巣における p21 陽性率は, 54.5% で特に増加せず, p21 のリンパ節転移における関与は明らかでなかった。

5) Western blotting 法における p21 発現と, 免疫組織化学的染色における p21 発現の有無の判定は一致

した。

以上の結果から, ras 癌遺伝子は, 子宮頸部扁平上皮癌において, 癌の進展, 転移よりも, むしろ癌化の過程により深く関与しているものと考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 研究に際して多大の御助言をいただき, 貴重な抗体を提供していただきました北大医学部癌研分子遺伝部門葛巻暹教授に深甚なる謝意を表します。また, 多大の御教示をいただき御指導, 御校閲を賜りました恩師橋本正淑教授に深甚なる謝意を表します。並びに, 御校閲の上, 有益な視点を御指導下さいました本学病理学第一講座菊地浩吉教授, 内科学第一講座谷内 昭教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- Land, H., Parada, F. L. and Weinberg, A. R.: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. **Science** **222**, 771-778 (1983).
- Slamon, J. D., Dekernion, J. B., Verma, M. I. and Cline, J. M.: Expression of cellular oncogenes in human malignancies. **Science** **224**, 256-262 (1984).
- Shih, Y. T. and Weeks, O. M.: Oncogenes and cancer: The p21 ras Genes. **Cancer Invest.** **2**, 109-123 (1984).
- Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.** **29**, 577-580 (1981).
- Kuzumaki, N., Oda, A., Yamagiwa, S., Taniguchi, N., Kobayashi, H. and Oikawa, T.: Establishment of four mouse hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies reactive with ras oncogene product p21. **J N C I** **77**, 1273-1279 (1986).
- Thor, A., Horan Hand, P., Wunderlich, D., Caruso, A., Muraro, R. and Schlom, J.: Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. **Nature** **311**, 562-565 (1984).
- Kuzumaki, N., Minakawa, H., Miyazaki, T., Haraguchi, S., Matsuo, T. and Yoshida, O. T.: Individually distinct tumor-specific cell surface antigen identified by monoclonal antibody on a rous sarcoma virus-induced mouse tumor. **J N C I** **69**, 527-530 (1982).
- Tanaka, T., Slamon, J. D., Battifora, H. and Cline, J. M.: Expression of p21 ras oncoproteins in human cancer. **Cancer Res.** **46**, 1465-1470 (1986).
- Debortoli, M. E., Abou-Issa, H., Haley, B. E. and Cho-Chung, Y. S.: Amplified expression of p21 ras protein in hormone-dependent mammary carcinomas of humans and rodents. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **127**, 699-706 (1985).
- Der, J. C. and Cooper, M. G.: Altered gene product are associated with activation of cellular ras^k genes in human lung and colon carcinomas. **Cell** **32**, 201-208 (1983).
- Fromowitz, B. F., Viola, V. M., Chao, S., Oravez, S., Mishriki, Y., Finkel, G., Grimson, R. and Lundy, J.: ras p21 expression in the progression of breast cancer. **Hum. Pathol.** **18**, 1268-1275 (1987).
- Rodenburg, J. C., Koelma, A. I., Nap, M. and Fleuren, J. G.: Immunohistochemical detection of the ras oncogene product p21 in advanced ovarian cancer: Lack of Correlation With Clinical Outcome. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **112**, 151-154 (1988).
- Ohuchi, N., Thor, A., Page, L. D., Horan Hand, P., Halter, A. S. and Schlom, J.: Expression of the 21,000 molecular weight ras protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. **Cancer Res.** **46**, 2511-2519 (1986).
- 中島公博: ヒト胃癌における ras 癌遺伝子産物 p21 発現の免疫組織化学的検討. **北海道医誌** **62**, 573-580 (1987).
- Michelassi, F., Leuthner, S., Lubinski, M., Bostwick, D., Rodgers, J., Handcock, M. and Block, E. G.: Ras oncogene p21 levels parallel malignant potential of different human colonic benign conditions. **Arch. Surg.** **122**, 1414-1416 (1987).
- Willingham, M. C., Pastan, I., Shih, T. Y. and Scolnick, E. M.: Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunohistochemistry. **Cell** **19**, 1005-1014 (1980).
- Horan Hand, P., Thor, A., Wunderlich, D., Muraro, R., Caruso, A. and Schlom, J.: Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**, 5227-5231 (1984).
- Fujita, K., Ohuchi, N., Yao, T., Okumura, M., Fukushima, Y., Kanakura, Y., Kitamura, Y. and

- Fujita, J.: Frequent overexpression, but not activation by point mutation, of ras genes in primary Human gastric cancers. **Gastroenterology** 93, 1339-1345 (1987).
19. Noguchi, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Thor, A., Schlom, J., Tsunokawa, Y., Terada, M. and Sugimura, T.: Histological demonstration of antigenes reactive with anti-p21 ras monoclonal antibody (RAP-5) in human stomach cancers. **J NCI** 77, 379-385 (1986).
20. Viola, V. M., Fromowitz, F., Oravez, S., Deb, S., Finkel, G., Lundy, J., Horan Hand, P., Thor, A. and Schlom, J.: Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. **N. Engl. J. Med.** 314, 133-137 (1986).
21. Mizukami, Y., Nonomura, A., Hashimoto, T., Terahata, S., Matsubara, F., Michigishi, T. and Noguchi, M.: Immunohistochemical demonstration of ras p21 oncogene product in normal, benign and malignant human thyroid tissues. **Cancer** 61, 873-880 (1988).
22. Furth, E. M., Davis, J. L., Fleurdelys, B. and Scolnick, M. E.: Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of harvey sarcoma virus and of the cellular ras gene family. **J. Virol.** 43, 294-304 (1982).
23. Riou, G., Barrois, M., Le, M. G., George, M., Le Doussal, V. and Haie, C.: C-myc Proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. **Lancet** i, 761-763 (1987).
24. Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., Craef, M. A. and Gariglio, P.: High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. **Cancer Res.** 47, 4173-4177 (1987).
25. 葛巻 暹: 転移と癌遺伝子. **最新医学** 41, 2252-2256 (1986).
26. 古川秀介, 加藤康夫, 今井浩三, 谷内 昭: ヒト大腸癌におけるモノクローナル抗体を用いた ras 癌遺伝子産物 p21 の免疫組織学的検討. **消化器と免疫** 17, 206-209 (1986).
27. Matlashewski, G., Schneider, J., Banks, L., Jones, N., Murray, A. and Crawford, L.: Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. **EMBO J.** 6, 1741-1746 (1987).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学産婦人科学講座 久田孝司

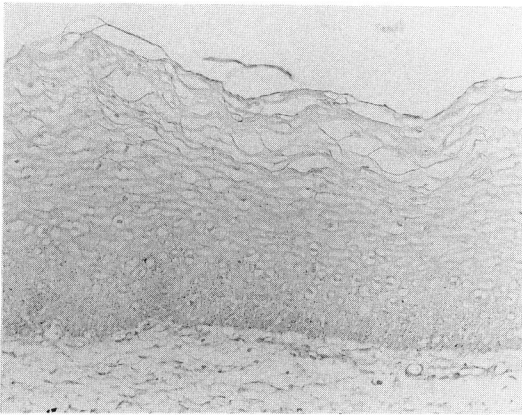


Fig. 1 Immunohistochemical staining for p21 in normal cervical epithelium. The basal layer cells and cells in the intermediate and superficial layers are completely negative. (170×)

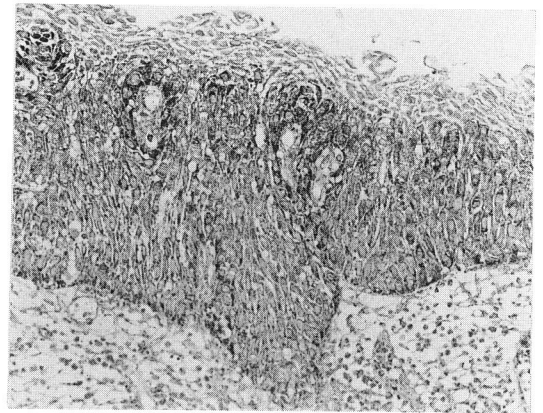


Fig. 3 Immunohistochemical staining for p21 in moderate dysplasia. p21 positive cells are distributed over the full thickness of the epithelium. (170×)

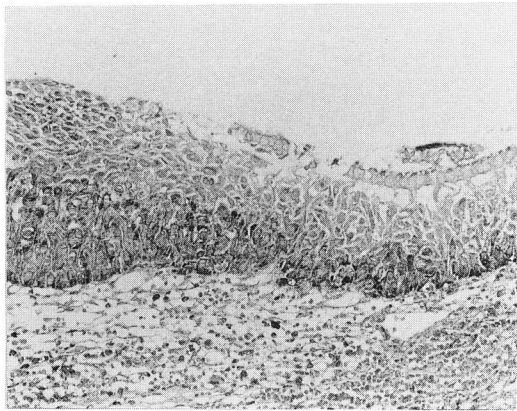


Fig. 2 Immunohistochemical staining for p21 in mild dysplasia. p21 positive cells are found in lower a third to half of the epithelium. (170×)

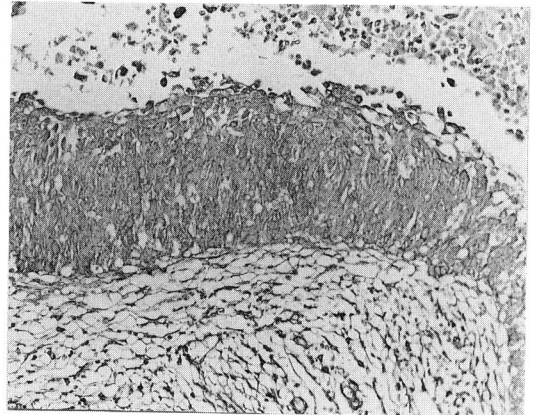


Fig. 4 Immunohistochemical staining for p21 in severe dysplasia. p21 positive cells are distributed over the full thickness of the epithelium. (170×)

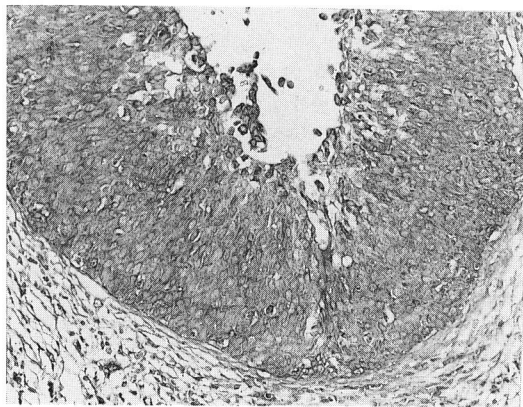


Fig. 5 Immunohistochemical staining for p21 in carcinoma in situ. p21 positive cells are stained more intensely. (170×)

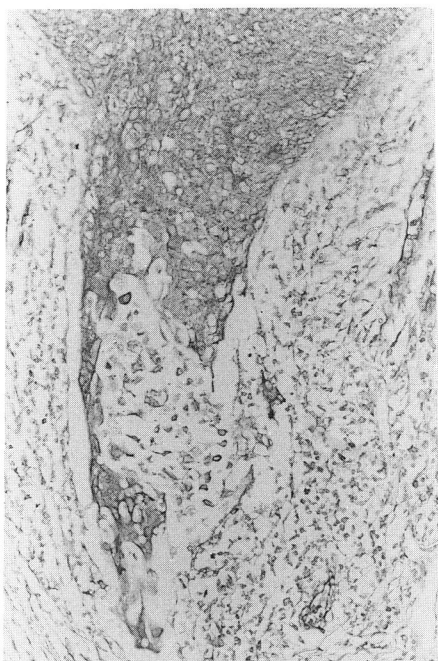


Fig. 6 Immunohistochemical staining for p21 in microinvasive carcinoma. p21 positive cells are stained more intensely in the infiltrating lesion. (170×)

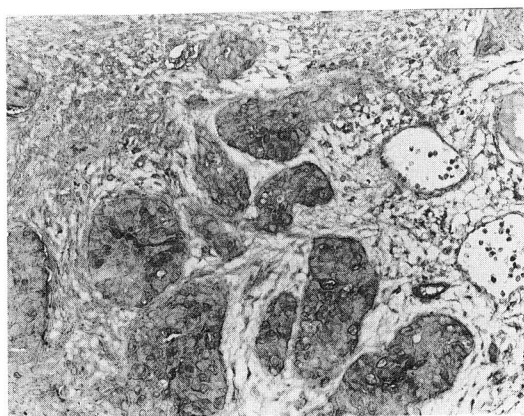


Fig. 7 Immunohistochemical staining for p21 in invasive carcinoma (K type). Intense cytoplasmic staining is apparent in most tumor cells. (170×)

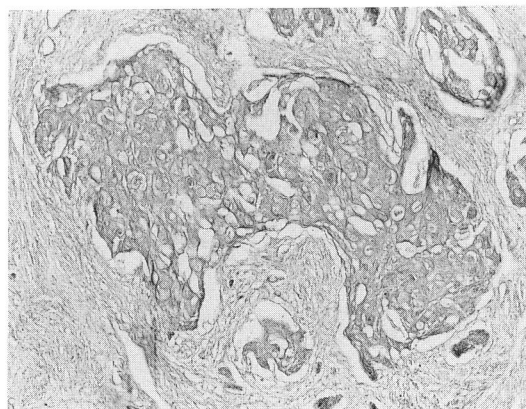


Fig. 8 Immunohistochemical staining for p21 in invasive carcinoma (LNK type). Each cytoplasm of p21 positive cell shows diffuse staining. (170×)

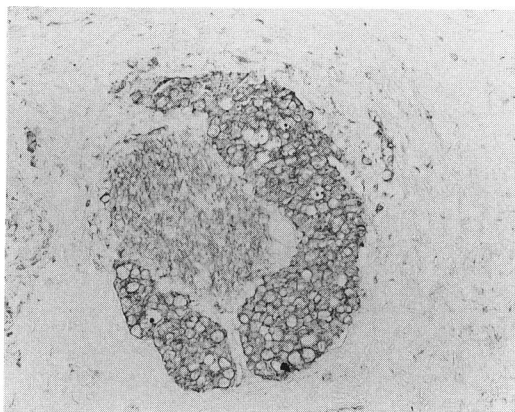


Fig. 9 Immunohistochemical staining for p21 in invasive carcinoma (S type). Each cytoplasm of p21 positive cell is diffusely stained. (170×)

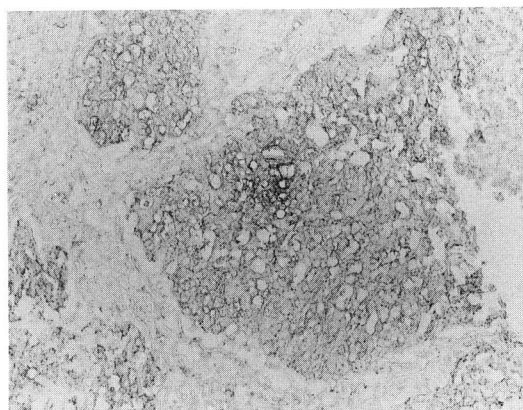


Fig. 10 Immunohistochemical staining for p21 in metastatic lymphnode. Each cytoplasm of p21 positive cell is diffusely stained. (170×)

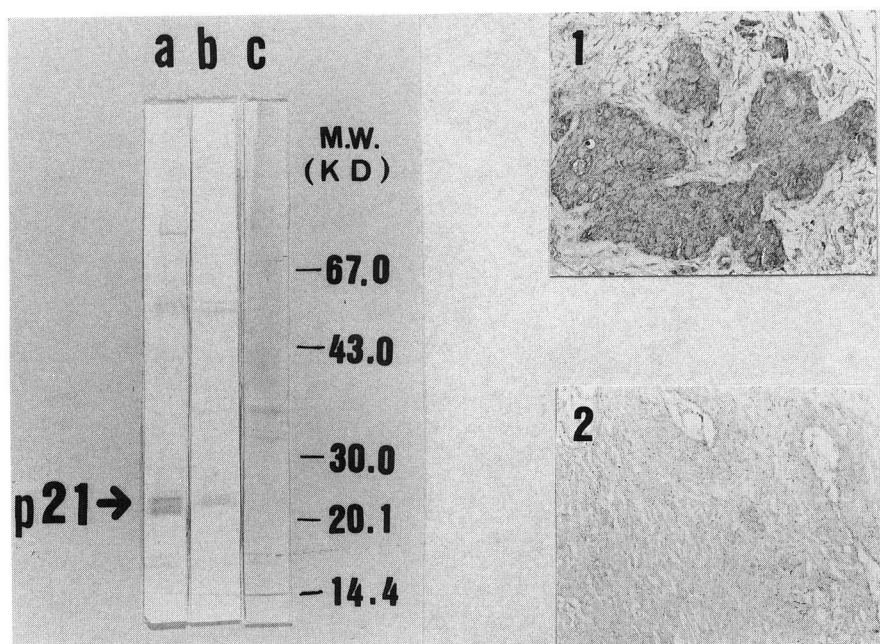


Fig. 11 Expression of p21 in invasive carcinomas by Western blotting. The extracts were derived from the tissues of mouse tumor (Lane a, positive control) and positive p21 case (Lane b, photo. 1 170×), negative p21 case (Lane c, photo. 2 170×) in immunohistochemical staining.